구강암종 세포주에서 은행잎 추출물(EGb 761)의 세포고사 효과

연세대학교 의과대학 이비인후과학교실,[1] 두뇌한국 21 의과학사업단[2]
이광현[1] · 윤주헌[1,2] · 이주환[1] · 권순호[1] · 서형석[1] · 김경수[1,2]

Effect of Ginkgo Biloba Extract(EGb 761) on Apoptosis in Oral Cavity Cancer Cells

Kwang-Hyeon Rhee, MD[1], Joo-Heon Yoon, MD[1,2], Joo-Hwan Lee, MD[1], Soon Ho Kwon, MD[1], Hyung Seok Seo, MD[1] and Kyung-Su Kim, MD[1,2]

[1]Department of Otorhinolaryngology, Yonsei University College of Medicine, Seoul; and
[2]Brain Korea 21 Project for Medical Sciences, Seoul, Korea

ABSTRACT

Background and Objectives : To examine the chemopreventive effects of Ginkgo biloba extract (EGb 761) on oral cavity cancer, we investigated the apoptosis of oral cavity cancer cells by EGb 761 and the apoptotic pathway involved. **Materials and Method** : SCC 1483 cancer cell line derived from a human retromolar trigone carcinoma was used. Inhibition of proliferation was examined by proliferation assay. Apoptosis was measured and confirmed by flow cytometry, DNA fragmentation assay and Western blotting with PARP antibodies. The involvement of the caspase cascade was investigated by co-treating with the caspase inhibitor, z-VAD-fmk. **Results** : The inhibition of SCC 1483 cells was noted from 250 μg/ml of EGb 761. Apoptosis was observed after 24 hours of incubation with 250 μg/ml EGb 761 and it occurred in a time-dependent manner. Apoptosis was confirmed by DNA fragmentation and PARP cleavage. Co-treatment with z-VAD-fmk inhibited apoptosis and PARP cleavage by EGb 761. **Conclusions** : EGb 761 induces the apoptosis of SCC 1483 cells and the caspase cascade is involved in this apoptosis. Therefore, EGb 761 may be used as a chemopreventive agent in oral cavity cancer. Further studies are required on the clinical use of EGb 761. **(Korean J Otolaryngol 2005;48:320-5)**

KEY WORDS : Ginkgo biloba · Oral cancer · Apoptosis · Caspases.

서 론

은행은 동양의학에서 수천년간 심장과 폐 질환의 치료제로서 이용되어온 천연물로,[1] 서양의학에서 관심을 끌게 된 것은 1965년 Dr Willmar Schwabe가 은행잎 추출물을 이용하여 순환장애, 뇌혈관 질환 등의 치료에 효과를 보았다고 발표한 것을 시발점으로 한다.[2]

은행잎 추출물중 EGb 761이라 명명된 물질은 아세톤과 물을 이용한 추출과정, 지방 친화성분의 제거, 활성물질 강화, 폴리페놀 성분 제거 등의 복잡한 추출과정을 거쳐 만들어진다. 이 추출물의 주요성분은 flavonoid 성분과 비flavonoid 성분으로 크게 구분되며, 상세성분은 약 24%의 flavonoid glycoside, 6%의 terpene trilactone(diterpenoid 성분인 ginkgolide와 sesquiterpene 성분인 bilobalide), 7%의 proanthocyanidin, 소량의 저분자 유기산 등으로 구성된다.[3]

EGb 761은 뇌 및 말초혈관의 혈류량 저하, 감각신경 질환, 기억력 및 인지능 저하 등의 질환에 대해 효과가 있는 것으로 알려져 있는데,[2] 최근 연구에 의하면 항산화 기능, 신생혈관 억제기능, 세포 독작용, COX-2 및 iNOS의 억제작용, 유전자 조절기능 등의 작용으로 세포증식 억제 효과를 보인다고 한다.[4][5]

현재 암 치료에 있어 수술 치료 외에 방사선 치료나 항암제와의 복합 치료요법이 개발되어 좋은 성적을 내고 있으나 구강암의 경우 아직까지 사망률이 높은 실정이다. 이런 높은 사망률을 보이는 이유로 근치적 수술 이후라도 재발이나 이차 원발암(second primary cancer)이 많아 예후가 좋지 않다.[6] 구강암의 이러한 속성상 구강암에 대한 근치적 수술, 방사선 치료, 항암제 치료 등의 복합요법 후에 암을

논문접수일 : 2004년 7월 9일 / 심사완료일 : 2004년 9월 6일
교신저자 : 김경수, 135-720 서울 강남구 도곡동 146-92
연세대학교 의과대학 이비인후과학교실
전화 : (02) 3497-3463 · 전송 : (02) 3463-4750
E-mail : ydrhinol@yumc.yonsei.ac.kr

억제할 수 있는 화학적 암억제제 또는 암예방제(chemopreventive agents)의 투여가 구강암 환자의 생존율을 높이는데 중요한 역할을 하게 된다.[7]

그러므로 구강암 치료에 있어 효과적이고 안정적인 암예방제의 개발이 시급한 실정이다. 은행잎 추출물인 EGb 761의 경우 경험의학이나 현대의학에서 많이 사용되고 있어 안정성 면에서 만족할 만하고 최근 연구에 의하면 대장암이나 전립선암의 경우 암예방제로 사용되어 좋은 효과를 보인다.[4][8] 그러나 EGb 761이 구강암에 대해 암예방제로서 가치가 있는 가에 관한 연구는 미흡한 실정이다.

이에 본 연구의 목적으로 EGb 761이 구강암종 세포주인 SCC-1483 세포에 대해 성장 억제작용이 있는 가를 알아보고 성장 억제가 세포고사에 의한 가를 관찰하며 이 세포고사가 어떤 기전으로 일어나는 가를 알고자 하였다.

재료 및 방법

구강암종 세포주 배양 및 세포증식 분석

사람 후구삼각(retromolar trigone)의 구강암에서 기원한 SCC 1483 구강암종 세포주(a generous gift from Dr. J Shah, Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, New York, New York, USA)를 MEM(minimum essential medium)과 10% fetal bovine serum, 2 mM L-glutamine, penicillin(50 μg/ml), streptomycin(50 μg/ml) 등으로 조성된 배지에서 배양하였다.

SCC 1483 세포를 well당 2000개씩 분주하여 96 well plate에서 16시간 동안 배양한 다음 무혈장 상태에서 0, 50, 100, 200, 250, 500 μg/ml 등의 EGb 761(a generous gift from Yuyu Co., Seoul, Korea)을 48시간 동안 투여한 후 세포증식 분석(CellTiter 96 AQueous One Solution cell proliferation assay : Promega, Madison, WI, USA)을 시행하였다. 방법으로 kit에 포함된 tetrazolium 합성물 2 ml와 phenazine ethosulfate 100 μl를 섞은 후 well당 20 μl의 혼합용액을 첨가하였다. 이후 1시간 동안 5% CO_2, 37℃의 조건하에 96 well plate를 배양한 후 spectrophotometer(490 nm 파장)로 optical density(O.D.)를 측정하였다.

유세포 측정분석

6 well plate의 각 well에 4×10^5의 SCC 1483 세포를 분주한 후 배양하여 세포가 50~60% 정도 합류를 이루었을 때 이전 실험에서 결정된 농도인 250 μg/ml의 EGb 761을 24시간 및 48시간동안 처치한 다음 부유세포 및 plate에 붙어있는 세포를 채취하였다. 이후 인산 완충용액(phosphate buffered saline)로 세포를 세척한 다음 TACS Annexin V-FITC kit(Trevigen Inc., Gaithersburg, MD, USA)를 이용하여 제조사의 프로토콜에 따라 propidium iodide(PI)으로 핵을 염색하고, FITC-Annexin V를 고사된 세포에 결합시켰다. 이후 Becton Dickinson FACSVantage SE(San Diego, CA, USA)를 이용하여 10,000개의 세포에 대해 flow cytometry를 시행한 다음, 결과상 그래프의 우상방(Annexin V 양성과 PI 양성)과 우하방(Annexin V 양성과 PI 음성)의 세포수를 계측하였다. 이 수치를 전체 세포로 나누어 이를 백분율로 구하여 세포고사로 정하였다. 대조군으로 EGb 761을 처치하지 않은 세포에 대하여 동일한 방법으로 0, 24, 48시간에 대해 실험을 하여 세포고사를 측정하였다. 통계 검증은 one-way ANOVA를 이용하여 대조군과 비교하여 유의수준 $p<0.05$를 유의한 것으로 하였다.

DNA ladder 분석

DNA 조각화 여부는 세포를 위와 같은 방법으로 배양한 다음 EGb 761 250 μg/ml을 24시간 동안 투여한 군과 투여하지 않은 군으로 구분하였다. 이후 각 군에 대해 부유세포 및 부착세포를 모두 채취하여 용해 완충액(100 mM Tris-HCl pH7.4, 5 mM EDTA, 0.2% SDS, 200 mM NaCl)으로 세포를 용해하였다. 용해된 세포를 phenol, chloroform, isopropanol 등을 이용하여 genomic DNA를 얻어 2% agarose gel에 120 V로 1시간 동안 전기영동하여 DNA 조각화 여부를 관찰하였다.

Western blot 분석

배양된 세포를 radioimmunoprecipitation assay buffer (1% NP-40, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS)을 이용하여 cell lysate를 만든 다음, 단백질의 양을 bovine serum albumin을 이용한 bicinchonic acid protein assay로 측정한 후 단백질 30 μg씩을 각 lane에 넣어 전기영동하였다.

전기영동은 6% SDS-polyacrylamide gel을 이용하였고 전기영동 후 nitrocellulose membrane에 전이시킨 다음 이 막을 TBST로 희석한 10% non-fat dry milk로 4℃에서 12시간 반응시킨 후 poly(ADP-ribose) polymerase(PARP) 항체(Cell Signaling Technology Inc., Beverly, MA, USA)(1 : 1000 농도)로 4℃에서 밤새 반응시켰다. 이후 TBST로 세척한 다음 horseredish peroxidase가 접합된 이차항체로 1시간 동안 처치한 다음 세척하였다. 이후 enhanced chemiluminescence(Amersham Phar-

macia Biotech, Piscataway, NJ, USA)와 autoradiography를 이용하여 밴드를 관찰하였다.

Caspase cascade 억제 실험

세포가 50~60% 정도 합류를 이루었을 때 250 μg/ml의 농도로 EGb 761을 24시간 동안 투여한 군, EGb 761과 caspase cascade 억제제인 10 μM의 benzyloxycarbonyl - Val - Ala - Asp - fluoromethyl ketone(z - VAD - fmk)(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)를 함께 투여한 군, 아무 처치도 하지 않은 대조군 등의 세 군으로 구분하여 부유세포 및 plate에 붙어있는 세포를 채취하였다. 이후 유세포 측정분석과 PARP 항체로 Western blot 분석을 하여 세포고사를 관찰하였다.

결 과

EGb 761 농도에 따른 SCC 1483 세포의 증식 억제

SCC 1483 세포에 대해 0, 50, 100, 200, 250, 500 μg/ml 등의 EGb 761을 48시간 동안 투여한 다음 세포증식 분석을 시행하였다. Spectrophotometer로 측정한 O.D.는 대조군 1.12±0.16, 50 μg/ml의 경우 1.03±0.09, 100 μg/ml는 0.94±0.14, 200 μg/ml의 경우 0.88±0.21, 250 μg/ml는 0.54±0.07, 500 μg/ml는 0.45±0.06 등이었다(Fig. 1). 세포증식 억제율을 알기 위해 {1 - (각 투여군의 평균 O.D./대조군의 평균 O.D.)}×100의 공식으로 백분율을 구하였다. 50, 100, 200, 250, 500 μg/ml 투여군 각각의 평균 세포증식 억제율은 8%, 16%, 21%, 52%, 60%로 250 μg/ml의 EGb 761부터 50% 이상의 증식 억제를 보였다(Table 1).

EGb 761 투여 시간에 따른 SCC 1483 세포의 세포고사

SCC 1483 세포에 대해 250 μg/ml의 EGb 761을 24시간, 48시간 동안 투여한 후 유세포 측정분석을 이용하여 세포고사를 측정하였다. 결과로 EGb 761 투여하지 않은 경우 투여 전(0시간)에 세포고사된 세포의 백분율은 8.6±1.2%, 24시간에는 9.7±1.1%, 48시간은 10.6±1.5%로 대조군 각 시간대에서는 상호간에 유의한 차이를 보이지 않았다. EGb 761을 24시간 동안 투여한 경우 세포고사가 25.7±2.0%, 48시간은 31.6±0.8%였다. 이러한 결과로 EGb 761을 250 μg/ml의 농도로 24시간 동안 투여한 경우 대조군에 비해 약 2.6배, 48시간 동안 투여한 경우는 약 3.1배의 세포고사가 발생하였으며 통계적으로 유의한 차이를 보였다(p<0.05)(Fig. 2).

EGb 761에 의한 SCC 1483 세포의 세포고사 확인

EGb 761을 250 μg/ml의 농도로 24시간 동안 투여한

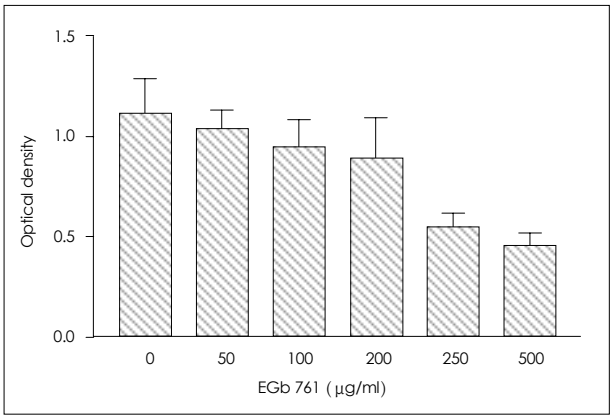

Fig. 1. Inhibition of SCC 1483 cell proliferation by EGb 761. SCC 1483 cells were treated with 0, 50, 100, 200, 250, and 500 μg/ml EGb 761 for 48 hours and cell proliferation was determined. Compared with control (0 or DMSO-treated cells), cell proliferation is noted from 250 μg/ml EGb 761 and is increased dose-dependently.

Table 1. Inhibition of SCC 1483 cells proliferation according to the concentrations of EGb 761

EGb 761 (μg/ml)	Inhibition (mean %)
50	8
100	16
200	21
250	52
500	60

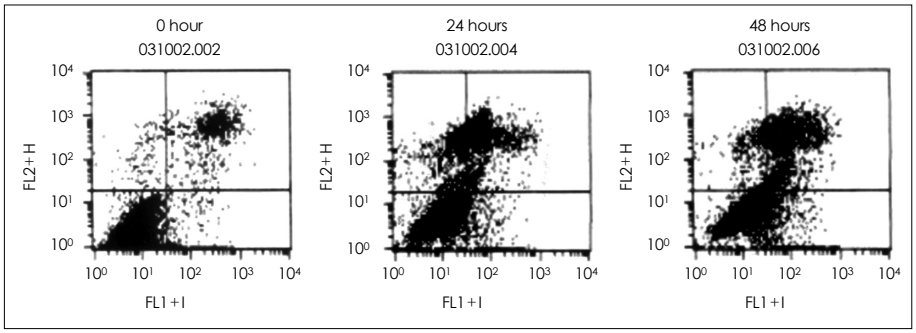

Fig. 2. Time-dependent apoptosis of SCC 1483 cells by EGb 761. SCC 1483 cells were incubated with 250 μg/ml EGb 761 for 24 and 48 hours and flow cytometry using Annexin V-FITC was performed. Compared with control (0 hour), the apoptotic cells of 24 hours incubation show approximately 2.6-fold increase and those of 48 hours incubation show approximately 3.1-fold increase.

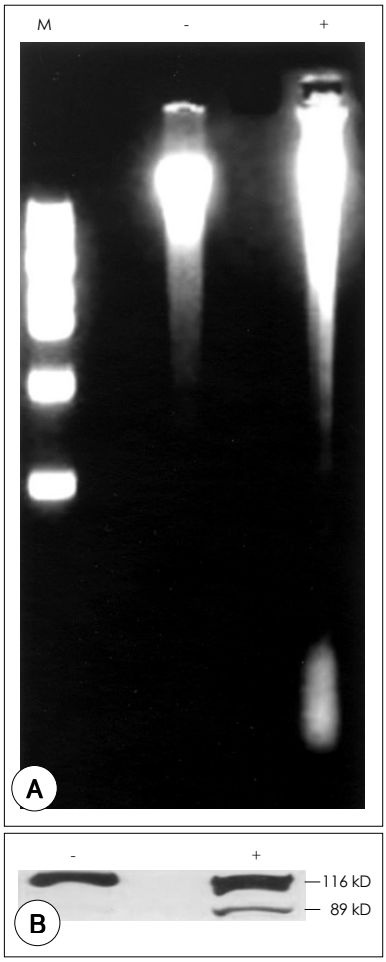

Fig. 3. A. DNA fragmentation of SCC 1483 cells by EGb 761. SCC 1483 cells were incubated with 250 μg/ml EGb 761 for 24 hours. Afterward, genomic DNA was extracted and the electrophoresis was done. Compared with control (-), genomic DNA of EGb 761-added cells (+) show the fragmented ladder pattern. B : Cleavage of PARP by EGb 761. SCC 1483 cells were incubated with 250 μg/ml EGb 761 for 24 hours and the cell lysate was made, and Western blot analysis with anti-PARP antibody was performed. Compared with control (-), the cells treated with EGb 761 (+) show the cleavage of PARP as 116 kDa and 89 kDa.

SCC 1483 세포에 대해 DNA를 추출하여 전기영동한 결과 DNA의 조각화가 관찰되어 EGb 761에 의한 SCC 1483 세포의 세포고사를 확인하였다(Fig. 3A).

또한 EGb 761에 의한 SCC 1483 세포의 세포고사를 확인하는 다른 방법으로 PARP의 분할 여부를 보고자 Western blot 분석을 시행하였다. 결과상 대조군에서는 약 116 kDa 크기의 PARP가 관찰되었고, EGb 761을 투여한 경우 116 kDa의 밴드와 89 kDa의 밴드가 관찰되어 PARP의 분할이 일어남을 알 수 있었다(Fig. 3B).

Caspase 억제제에 의한 세포고사 억제

PARP 분할에 caspase cascade가 관여하므로 caspase 억제제인 z-VAD-fmk를 투여하여 EGb 761에 의한 SCC 1483 세포의 세포고사가 억제되는 가를 보고자 하였다. SCC 1483 세포에 대해 250 μg/ml의 EGb 761을 24시간 동안 투여한 후 유세포 측정분석을 이용하여 세포고사를 측정하였다. 결과상 대조군의 경우 세포고사가 8.7±1.3%에서 발생하였고, EGb 761만을 투여한 경우 20.0±2.1%,

Table 2. Inhibition of apoptosis of SCC 1483 cells by co-treatment of EGb 761 and z-VAD-fmk

	Apoptosis (%)
Control	8.7±1.3
EGb 761	20.0±2.0
EGb+z-VAD-fmk	10.0±1.6

Value : mean±standard deviation

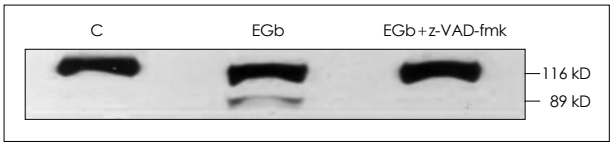

Fig. 4. Inhibition of cleavage of PARP by z-VAD-fmk. SCC 1483 cells were incubated with 250 μg/ml EGb 761 and were co-incubated with 250 μg/ml EGb 761 and 10 μM z-VAD-fmk for 24 hours. After then, the cell lysates were made and Western blot analysis with anti-PARP antibody was performed. Compared with control (-), the cells treated only with EGb 761 (EGb) show the cleavage of PARP as 116 kDa and 89 kDa. However, the cells treated both with EGb 761 and z-VAD-fmk (EGb+z-VAD-fmk) show uncleaved PARP as 116 kDa.

EGb 761과 z-VAD-fmk를 같이 투여한 경우는 10.5±1.6%의 세포고사가 각각 관찰되었다. 이러한 결과로 caspase 억제제를 투여한 경우 유의하게 EGb 761에 의한 세포고사가 억제됨을 알 수 있었다($p<0.05$)(Table 2).

또한 EGb 761에 의한 PARP 분할이 caspase 억제제에 의해 억제되는 가를 확인하기 위해 Western blot 분석을 한 결과 EGb 761에 의해 관찰되던 약 89 kDa의 밴드가 z-VAD-fmk와 EGb 761을 같이 투여할 경우 관찰되지 않고 분할되지 않은 116 kDa의 밴드만 관찰되었다(Fig. 4).

이러한 결과로 SCC 1483 세포에 대한 EGb 761의 세고고사 작용에는 caspase cascade가 관여함을 알 수 있었다.

고 찰

본 연구결과에서 은행잎 추출물인 EGb 761은 SCC 1483 구강암종 세포주에 대해 250 μg/ml의 용량에서부터 50% 이상의 세포증식 억제를 보였고 용량에 따라 증식 억제가 증가하였다. 그리고 이러한 성장억제는 본 실험상 유세포 측정결과, DNA의 계단모양 조각화 및 PARP의 분할 등의 결과로 세포고사에 의한 것으로 밝혀졌다. 이러한 결과는 EGb 761 성분에 의한 사람 유방암종 세포주인 MDA-231 세포주의 성장 억제 및 대장암 세포주에서의 성장 억제와 일치하였다.[4)9)] 이상의 결과로 EGb 761이 구강암종 세포주에 대해 세포고사를 유도하며 이러한 작용으로 암억제제로 이용될 가능성이 있다 하겠다. 그러나 암억제제로 사용하기 위해서는 임상적으로 안정성에 대한 고려가 중요하다.

본 연구결과에서 유효한 것으로 나타난 250 μg/ml은 다른 연구에서 EGb 761에 의한 세포증식 억제작용이 관찰되는 용량인 100~500 μg/ml에 포함되는 범위이다.[10-12] 또한 백서에 대한 연구에서 EGb 761을 구강으로 투여할 경우 급성 독성을 나타내는 LD_{50}은 7.73 g/kg였고, 정맥내로 주사할 경우 LD_{50}은 1.1 g/kg였으며, 복강내로 주사할 경우 LD_{50}은 1.9 g/kg였다.[13] 사람 몸무게 중 혈장은 4.4%를 차지하며 체중이 70 kg인 경우를 예로 들면 44 ml/kg의 혈장을 지니게 된다. 이를 토대로 250 μg/ml를 환산하면 11 mg/kg을 혈액내로 투여한 것이므로 백서에서 정맥내 투여량과 비교시 약 1/100의 양으로 매우 안전하다 하겠다.

임상적으로 EGb 761은 급성 독작용과 함께 장기간 복용으로 유발되는 만성 독작용도 중요하다. 쥐와 개에 대해 매일 400~500 mg/kg의 용량으로 26~27주 동안 투여시 장기에 부작용이 보이지 않았고 간과 신장에도 부작용이 관찰되지 않았다.[14] 본 연구에 사용된 250 μg/ml을 체중 70 kg를 기준으로 환산하면 투여량이 11 mg/kg이므로, EGb 761을 장기간 복용시 신경계, 선조직과 눈 등에 최대 20배 정도가 축척된다는 보고[14]를 감안할 경우 최대 220 mg/kg의 용량이 정맥내로 투여된 것과 같으므로 상기한 동물실험에서의 결과[14]와 비교시 장기간 투여에도 안전한 용량이라고 생각한다.

EGb 761은 여러 성분이 복합되어 있는 복합제이므로 불필요한 성분을 줄여 투여 용량을 줄이고 최소한의 성분 투여에 의해 부작용을 극소화 시킬 수 있는 방법으로 성분별 투여가 있다. 성분별 투여의 예로 MDA-231 세포주에 대해 EGb 761의 성분중 하나인 IPS 200은 2~200 μg/ml, ginkolide B는 0.2~20 μg/ml의 농도에서 세포증식을 억제하였다.[9] 다른 예로, 대장암 세포주에서 quercetin과 kaempferol과 같은 flavonoid 성분이 암치료에 유효하며,[4] 전립선암에 대해서는 kaempferol이 암 발생 위험도를 감소시키고,[8] flavonoid glycoside의 하나인 rutin은 aflatoxin B1과 N-nitrosodimethylamine에 의한 간암을 억제한다고 한다.[15] 이처럼 성분별 투여는 본 연구에서 사용된 250 μg/ml보다 낮은 농도에서 세포증식 억제가 가능하였다. 이러한 결과에서 나타나듯이 약제에 대한 각 세포의 감수성을 감안하더라도 성분별 투여가 전체 약제를 투여하는 것보다 장점을 보이므로 향후 성분별 투여에 의한 세포증식 억제에 대한 연구가 필요하리라 본다.

PARP는 약 116 kDa 크기의 핵단백질로 NAD+를 기질로 하여 여러 핵단백질의 유전암호해독 후 변화(posttranslational modification)에 작용한다. 또한 DNA에 대한 poly(ADP-ribosyl) nuclear protein의 결합을 억제하고, chromatin 구조의 응축을 억제하며 DNA 복구를 가능하게 하여 유전자 안정성을 유지하게 한다. 이 단백의 분할은 생체외 실험상 여러 ICE 유사 caspase에 의해, 생체 실험상 caspase cascade의 주된 분할 표적이 되어 분할이 발생하며 이런 분할에 의해 PARP가 불활성화되어 세포고사가 일어나게 된다.[16][17] 본 연구에서 caspase에 대한 비특이 억제제[18]인 z-VAD-fmk를 EGb 761과 같이 투여하여 EGb 761에 의한 세포고사의 억제 여부와 PARP 단백의 분할 억제 등을 관찰하였다. z-VAD-fmk를 같이 투여하여 유세포 측정분석을 한 결과 세포고사가 억제되어 대조군과 차이를 보이지 않았고, Western blot 분석 상 PARP의 분할이 일어나지 않아 EGb 761에 의한 세포고사의 하위 기전(downstream mechanism)에 caspase cascade가 관여함을 알 수 있었다. EGb 761에 의한 세포고사의 상위 기전(upstream mechanism)은 아직 확실히 밝혀지지 않은 상태로 본 연구에 이용된 SCC 1483 세포가 cyclooxygenase-2와 암억제 유전자인 p53을 표현하는 세포이므로[19] 이들의 변화도 하나의 가능성이 될 수 있으며 향후 EGb 761에 의한 세포고사의 상-하위 기전에 대한 추가연구가 필요하리라 생각한다.

결 론

은행잎 추출물인 EGb 761을 구강암종 세포주인 SCC 1483 세포에 250 μg/ml의 용량으로 24시간 동안 투여시 대조군에 비해 유의하게 세포증식 억제와 세포고사를 보이며 이러한 세포고사에는 caspase cascade가 관여함을 알 수 있었다.

본 연구의 결과를 토대로 은행잎 추출물인 EGb 761이 구강암에 대하여 암예방제로서 사용될 가능성이 있다고 생각하며 향후 임상적 이용을 위한 실험과 기전에 대한 추가연구 등이 필요하다고 본다.

중심 단어 : 은행잎 추출물 · 구강암 · 세포고사 · Caspase cascade.

REFERENCES

1) Michel PF. *The doyen of trees: The Ginkgo biloba. Presse Med 1986; 15:1450-4.*
2) DeFeudis FV. *Ginkgo biloba extract (EGb 761): Pharmacological activities and clinical applications. Paris: Elsevier;1991. p.1-8.*
3) DeFeudis FV, Papadopoulos V, Drieu K. *Ginkgo biloba extracts and cancer: A research area in its infancy. Fundam Clin Pharmacol 2003;17:405-17.*
4) Mutoh M, Takahashi M, Fukuda K, Matsushima-Hibiya Y, Mutoh H,

Sugimura T, *et al. Suppression of cyclooxygenase-2 promoter-dependent transcriptional activity in colon cancer cells by chemopreventive agents with a resorcin-type structure. Carcinogenesis 2000;21:959-63.*

5) Raso GM, Meli R, Di Carlo G, Pacilio M, Di Carlo R. *Inhibition of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 expression by flavonoids in macrophage J774A.1 Life Sci 2001;68:921-31.*
6) Levine PA, Hood RJ. *Neoplasms of the oral cavity. In: Bailey BJ, Calhoun KH, editors. Head & Neck Surgery-Otolaryngology. 3rd ed. Philadelphia: Lippincott;2001. p.1311-25.*
7) Contreras Vidaurre EG, Bagan Sebastian JV, Gavalda C, Torres Cifuentes EF. *Retinoids: Application in premalignant lesions and oral cancer. Med Oral 2001;6:114-23.*
8) Griffiths K, Morton MS, Denis L. *Certain aspects of molecular endocrinology that relate to the influence of dietary factors on the pathogenesis of prostate cancer. Eur Urol 1999;35:443-55.*
9) Papadopoulos V, Kapsis A, Li H, Amri H, Hardwick M, Culty M, *et al. Drug-induced inhibition of the peripheral-type benzodiazepine receptor expression and cell proliferation in human breast cancer cells. Anticancer Res 2000;20:2835-47.*
10) Gohil K, Moy RK, Farzin S, Maguire JJ, Packer L. mRNA *expression profile of a human cancer cell line in response to Ginkgo biloba extract: Induction of antioxidant response and the Golgi system. Free Radic Res 2000;33:831-49.*
11) Chen JX, Zeng H, Chen X, Su CY, Lai CC. *Induction of heme oxygenase-l by Ginkgo biloba extract but not its terpenoids partially mediated its protective effect against lysophosphatidylcholine-induced damage. Pharmacol Res 2001;43:63-9.*
12) Luo Y, Smith JV, Paramasivam V, Burdick A, Curry KJ, Buford JP, *et al. Inhibition of amyloid-β aggregation and caspase-3 activation by the Ginkgo biloba extract EGb761. Proc Natl Acad Sci USA 2002;99:12197-202.*
13) Drieu K. *Preparation and definition of Ginkgo biloba extract. In: Funfgeld EW, editor. Rokan, Ginkgo biloba: Recent results in pharmacology and clinic. Berlin: Springer-Verlag;1988. p.32-6.*
14) DeFeudis FV. *Ginkgo biloba extract (EGb 761): Pharmacological activities and clinical applications. Paris: Elsevier;1991. p.143-6.*
15) Webster RP, Gawde MD, Bhattacharya RK. *Protective effect of rutin, a flavonol glycoside, on the carcinogen-induced DNA damage and repair enzymes in rats. Cancer Lett 1996;109:185-91.*
16) Tewari M, Quan LT, O'Rourke K, Desnoyers S, Zeng Z, Beidler DR, *et al. Yama/CPP32 beta, a mammalian homolog of CED-3, is a CrmA-inhibitable protease that cleaves the death substrate poly (ADP-ribose) polymerase. Cell 1995;81:801-9.*
17) Oliver FJ, de la Rubia G, Rolli V, Ruiz-Ruiz MC, de Murcia G, Murcia JM. *Importance of poly (ADP-ribose) polymerase and its cleavage in apoptosis. Lesson from an uncleavable mutant. J Biol Chem 1998;273:33533-9.*
18) Nicholson DW, Ali A, Thornberry NA, Vaillancourt JP, Ding CK, Gallant M, *et al. Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis Nature 1995;376:37-43.*
19) Kim MS, Li SL, Bertolami CN, Cherrick HM, Park NH. *State of p53, Rb and DCC tumor suppressor genes in human oral cancer cell lines. Anticancer Res 1993;13:1405-13.*